

## METHODS FOR RAPIDLY PRODUCING TRANSGENIC MONOCOTYLEDONOUS PLANTS

**Patent number:** WO0173084  
**Publication date:** 2001-10-04  
**Inventor:** ALTPETER FREDY (DE); POPELKA JUAN-CARLOS (DE)  
**Applicant:** INST PFLANZENGENETIK & KULTUR (DE); ALTPETER FREDY (DE); POPELKA JUAN CARLOS (DE)  
**Classification:**  
- **international:** **C12N15/82; C12N15/82;** (IPC1-7): C12N15/82  
- **european:** C12N15/82A4B; C12N15/82A6D; C12N15/82A8  
**Application number:** WO2001DE01209 20010323  
**Priority number(s):** DE20001015458 20000329

**Also published as:**

WO0173084 (A3)  
DE10015458 (A1)

**Cited documents:**

WO9832326  
WO9001551  
DE4309203  
WO9967357  
XP002178924  
more >>

**Report a data error here**

**Abstract of WO0173084**

The invention relates to a method for producing transgenic, fertile, monocotyledonous plants, in particular, for producing transgenic wheat, barley and rye by introducing foreign DNA while achieving stable heredity of the transgenic expression in sexual offspring. The invention consists of three variants which lead to the rapid production of fertile and normal transgenic monocotyledonous plants. The invention results in minimizing the occurrence of somaclonal variation. This mutagenesis, which often occurs during the tissue culture and selection of genetic transformation events in monocotyledonous cultivated plants, often leads to undesired features such as fertility disorders or reduced vigorousness and yield potential up to a loss in ability of the tissue cultures to regenerate into plants. Wheat and barley are examples of plants which are difficult to regenerate out of tissue cultures and into plants due to frequently occurring tissue culture-related mutagenesis and are thus difficult to be able to genetically transform. Rye is an example of a plant that, due to particularly frequent tissue culture-related mutagenesis, is especially difficult to regenerate out of tissue cultures and into plants and is thus particularly difficult to be able to genetically transform. The depicted methods contain examples of producing fertile transgenic plants of rye, wheat and barley using biolistic-mediated and *Agrobacterium*-mediated gene transfer as well as their generative offspring with stable transgenic integration and expression. The inventive methods require a period of only less than two to a maximum of three months from the moment of explant extraction up to the transfer of the transgenic plants into soil.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
4. Oktober 2001 (04.10.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/73084 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/82

KULTURPFLANZENFORSCHUNG (IPK) [DE/DE];  
Corrensstrasse 3, 06466 Gatersleben (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/01209

(22) Internationales Anmeldedatum:  
23. März 2001 (23.03.2001)

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): ALTPETER, Fredy  
[DE/DE]; An der alten Mühle 13, 06466 Gatersleben  
(DE). POPELKA, Juan-Carlos [DE/DE]; Corrensstrasse  
3, 06466 Gatersleben (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(74) Anwalt: BAUMBACH, F.; Robert-Rössle-Str. 10, 13125  
Berlin (DE).

(30) Angaben zur Priorität:  
100 15 458.1 29. März 2000 (29.03.2000) DE

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US*): INSTITUT FÜR PFLANZENGENETIK UND

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHODS FOR RAPIDLY PRODUCING TRANSGENIC MONOCOTYLEDONOUS PLANTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR RASCHEN HERSTELLUNG VON TRANSGENEN, EINKEIMBLÄTTRIGEN PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing transgenic, fertile, monocotyledonous plants, in particular, for producing transgenic wheat, barley and rye by introducing foreign DNA while achieving stable heredity of the transgenic expression in sexual offspring. The invention consists of three variants which lead to the rapid production of fertile and normal transgenic monocotyledonous plants. The invention results in minimizing the occurrence of somaclonal variation. This mutagenesis, which often occurs during the tissue culture and selection of genetic transformation events in monocotyledonous cultivated plants, often leads to undesired features such as fertility disorders or reduced vigorousness and yield potential up to a loss in ability of the tissue cultures to regenerate into plants. Wheat and barley are examples of plants which are difficult to regenerate out of tissue cultures and into plants due to frequently occurring tissue culture-related mutagenesis and are thus difficult to be able to genetically transform. Rye is an example of a plant that, due to particularly frequent tissue culture-related mutagenesis, is especially difficult to regenerate out of tissue cultures and into plants and is thus particularly difficult to be able to genetically transform. The depicted methods contain examples of producing fertile transgenic plants of rye, wheat and barley using biolistic-mediated and *Agrobacterium*-mediated gene transfer as well as their generative offspring with stable transgenic integration and expression. The inventive methods require a period of only less than two to a maximum of three months from the moment of explant extraction up to the transfer of the transgenic plants into soil.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von transgenen, fertilen, einkeimblättrigen Pflanzen, insbesondere die Herstellung von transgenem Weizen, Gerste und Roggen, durch Einführung von Fremd-DNA unter Erreichung stabiler Vererbung der Transgenexpression in sexuellen Nachkommenschaften. Die Erfindung besteht aus drei Varianten, die zur raschen Erstellung von fertilen und normalen transgenen, einkeimblättrigen Pflanzen führen. Die Erfindung resultiert in einer Minimierung des Auftretens von somaklonaler Variation. Diese häufig während der Gewebekultur und Selektion von genetischen Transformationsereignissen bei einkeimblättrigen Kulturpflanzen auftretende Mutagenese führt häufig zu unerwünschten Eigenschaften, wie Fertilitätsstörungen oder verringerter Wüchsigkeit und Ertragsfähigkeit bis hin zu Verlust der Regenerationsfähigkeit der Gewebekulturen zu Pflanzen. Weizen und Gerste sind Beispiele für Pflanzen, die aufgrund häufig auftretender gewebekulturbedingter Mutagenese schwer aus Gewebekulturen zu Pflanzen zu regenerieren sind und damit schwer genetisch transformierbar sind. Roggen ist ein Beispiel für Pflanzen die aufgrund besonders häufiger gewebekulturbedingter Mutagenese besonders schwer aus Gewebekulturen zu Pflanzen zu regenerieren ist und damit besonders schwer genetisch transformierbar ist. Die dargestellten Verfahren beinhalten Beispiele der Erstellung fertiler transgener Pflanzen von Roggen, Weizen und Gerste mittels biolistischem- und *Agrobacterium*-vermitteltem Gentransfer, sowie deren generative Nachkommenschaften mit stabiler Transgenintegration und Expression. Die erfindungsgemässen Verfahren erfordern lediglich weniger als zwei bis maximal drei Monate vom Zeitpunkt der Explantatgewinnung bis zur Übertragung der transgenen Pflanzen in Erde.

WO 01/73084 A2



MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,  
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

## Verfahren zur raschen Herstellung von transgenen, einkeimblättrigen Pflanzen

### Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von transgenen, fertilen, monokotylen Pflanzen.

In den letzten 15 Jahren ist es möglich geworden, Gene durch rekombinante Gentechnik von einer großen Anzahl von Organismen auf Nutzpflanzen zu übertragen. Dieser Fortschritt hat enorme Möglichkeiten eröffnet, die Resistenz der Pflanzen gegen Schädlinge, Krankheiten und Herbizide zu verbessern, und sowohl Biosyntheseprozesse zu modifizieren, um die Qualität von Pflanzenprodukten zu verändern, als auch neue Wertstoffe in Nutzpflanzen zu erzeugen (Knutson et al. PNAS USA 89, 2624-2628 (1992); Piorier et al., Science 256, 520-523 (1992); Vasil et al., Bio/Technologie 10, 667 - 674 (1992)).

Drei alternative Transformationsmethoden werden gegenwärtig für Monokotyledonenspezies benutzt : direkter DNA-Transfer in isolierte Protoplasten (Shimamoto et al., Nature 338, 274 - 276 (1989)), partikelbeschuß-vermittelte DNA-Übertragung (Fromm et al. Bio/Technologie 8, 833 - 839 (1990)), und *Agrobacterium*-vermittelte Transformation (Cheng et al. Plant Physiol. 115, 971 - 980 (1997)).

Die Protoplastenmethoden sind weithin für Reis benutzt worden, wobei DNA durch Liposomen, PEG und Elektroporation in Protoplasten übertragen wird. Eine große Anzahl transgener Pflanzen wurden in verschiedenen Laboratorien aufgezogen (Shimamoto et al. (1989); Datta et al. Bio/Technologie 8, 736 - 740 (1990)), jedoch erfordert die Protoplastenmethode die Langzeitetablierung von embryogenen Suspensionskulturen. Einige Regenerate von Protoplastenkulturen sind unfruchtbar und phänotypisch abnormal infolge der langzeitigen Suspensionskultur (Davey et al. J Exp. Bot. 42, 1129 - 1169 (1991); Rhodes et al. Science 240, 204 - 207 (1988)).

Die Partikelbeschuß- oder *Agrobacterium*-vermittelten Übertragungsmethoden haben von unreifen Explantaten induzierte Kalli als Ziele verwendet. Nach Partikelbeschuß sind transgene

Pflanzen von Reis, Gerste, Weizen und Roggen beschrieben worden (Christou et al. Bio/Technology 9, 957 - 962 (1991); Gordon-Kamm et al. Plant Cell 2, 603 - 6128 (1990); Somers et al. Bio/Technology 10, 1589 - 1594 (1992), Wan et al. Plant Physiol. 104, 37 - 48 (1994), Vasil et al. (1992), Castillo et al. Bio/Technology 12, 1366 - 1371 (1994)) und nach *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer sind transgene Pflanzen von Reis, Gerste und Weizen beschrieben worden (Hiei et al. Plant J. 6, 271 - 282 (1994); Ishida et al. Nature Biotechnol. 14, 745 - 750 (1996); Tingay et al. Plant J. 11, 1369 - 1376 (1997); Cheng et al. Plant Physiol. 115, 971 - 980 (1997)).

Bisher gibt es nur einen Bericht, der die Erzeugung transgener Roggenpflanzen beschreibt. Dem biolistischen Gentransfer folgten Kallusselektion mittels eines entsprechenden selektiven Agens und die Regeneration von zwei transgenen Pflanzen (Castillo et al. Bio/Technology 12, 1366 - 1371 (1994)). Die Methode ist zeitaufwendig und erfordert 8 bis 9 Monate von der Gewinnung der Explantate bis zum Erhalt transgener Pflanzen. Außerdem leidet diese Methode an einem Verlust an Regenerierbarkeit des transgenen Kallus. Nur 33 % der transgenen Kalli konnten noch regeneriert werden, nachdem die Selektion auf Expression des selektierbaren Markergens *bar* erfolgt war, das für die Phosphinotricin-Acetyl-Transferase kodiert. Darüber hinaus besagt die Tatsache, dass nur zwei unabhängige transgene Pflanzen, hervorgegangen aus einem einzigen Experiment, erzeugt wurden, dass es sich um einen ersten Bericht über transgene Roggenpflanzen handeln muß und nicht um ein reproduzierbares Verfahren. Tatsächlich sind auch seit 1994 keine weiteren Berichte über transgene Roggenpflanzen veröffentlicht worden. Dieser Reproduzierbarkeitsgrad ist sicher zu gering für genetische Studien und für wirtschaftliche Anwendungen. Die Effizienz des beschriebenen Verfahrens war außerdem sehr gering, da 1383 Explantate benötigt wurde, um 2 transgene Roggenpflanzen zu erzeugen.

Bekanntermaßen werden selektierbare Markergene benutzt, um transgene Ereignisse während des *in vitro*-Prozesses der Pflanzentransformation zu identifizieren, aber sie stehen in keiner Beziehung zur Verbesserung der Nutzpflanze und sind deshalb nicht erforderlich, nachdem die transgene Pflanze einmal hergestellt worden ist. Selektierbare Markergene der Gruppe I kodieren z.B. Herbizid- oder Antibiotika-Resistenz und erlauben deshalb die Ausübung eines Selektionsdrucks mittels eines entsprechenden cytotoxischen selektiven Agens, um Zellteilungen und Pflanzenregeneration in nichttransformiertem Gewebe zu unterdrücken (Velten und Schell

Nucleic Acid Res. 13, 6981 - 6987 (1985)). Die Zugabe von Herbizid- oder Antibiotika-Komponenten als selektive Agentien zu Pflanzenzellen hat häufig einen negativen Effekt nicht nur auf die nichttransformierten Zellen sondern auch auf transgene Zellen und kann daher mit dem Regenerationsprozeß interferieren und speziell die Effizienz und Reproduzierbarkeit der Produktion transgener Pflanzen insbesondere bei "widerspenstigen" Arten wie Roggen, Gerste und Weizen herabsetzen. Eine zweite Gruppe selektierbarer Marker unterstützt infolge ihres Einflusses auf den pflanzlichen Stoffwechsel Wachstum und Regeneration transformierter Zellen unter speziellen Kulturbedingungen, z.B. Phosphomannoseisomerase oder IPT (Joersbo et al. Physiol. Plant. 105, 109 - 111 (1999); Ebinuma et al. 94, 2117 - 2121 (1997)).

Wenn selektierbare Marker in transgenen Pflanzen bleiben, müssen ihre Genprodukte hinsichtlich ihres Effektes auf biologische Sicherheit und Umwelt analysiert werden. Derartige Sicherheitsuntersuchungen können die Kommerzialisierung transgener Pflanzen verzögern oder sogar blockieren. Die Reaktion der Öffentlichkeit auf das Problem der selektierbaren Marker bakterieller Herkunft kann einen negativen Effekt auf das kommerzielle Potential transgener Kulturpflanzen haben, auch wenn die Sicherheit der selektierbaren Marker wissenschaftlich nachgewiesen worden ist (Malik und Saroha J. Plant Biochem. Biotechnol. 8, 1 - 13 (1999)). Wenn multiple Transgene in denselben genetischen Hintergrund eingefügt werden müssen, sind mehrere verschiedene selektierbare Markergene erforderlich.

Um Risiko und Probleme, die mit selektierbaren Markern verbunden sind, zu verringern, sind Transformationssysteme entwickelt worden, welche die Eliminierung der Markergene nach der Transformation erlauben. In Cotransformationssystemen werden Markergene und Nutztransgene als unverknüpfte Fragmente in das Pflanzengenom eingefügt, und wenn sie in ungekoppelte Genloci gelangen, dann können sie in spaltenden sexuellen Nachkommenschaften getrennt werden. Die Gesamteffizienz für die Erzeugung der gewünschten markergen-freien aber nutztransgen-tragenden Ereignisse ist dabei gegenüber einer Erzeugung von nutztransgen-tragenden Ereignissen mit Beibehaltung der Markergene reduziert. Diese herabgesetzte Effizienz ist die Folge niedriger Kotransformationsraten und häufiger Integration unterschiedlicher Plasmide an gekoppelten Genloci ohne deren Segregation in der nachfolgenden Generation (McKnight et al. Plant Mol. Biol. 8, 439 - 445 (1987), Deblock und Debrouwer Theor. Appl. Genet. 82, 257 - 263 (1991), Komari et al. Plant J. 10, 165 - 174 (1996)). Gerichtetes Herausschneiden der selektierbaren Markergene mittels ortsspezifischer Rekombination (Russel et al. Mol. Gen. Genet. 234, 49 - 59 (1992)) oder Transpositions-vermittelter Repositionierung

(Goldsbrough et al. Bio/Technology 11, 1286 - 1292 (1993)), gefolgt von Spaltung in Markergene und Nutztransgene in der sexuellen Nachkommenschaft, sind erfolgreich zur Produktion Markergen-freier transgener Pflanzen eingesetzt worden. Jedoch ist die Konstruktion entsprechender relevanter Transformationsvektoren recht kompliziert und die Aktivierung der enzymgestützten Excision erfordert entweder recht zeitaufwendige sexuelle Kreuzungen gefolgt von Spaltungsanalysen (Goldsbrough et al. Bio/Technology 11, 1286 - 1292 (1993)) oder die transiente Expression der Excision-vermittelnden Enzyme. Die transiente Expression Excision-vermittelnder Enzyme geht häufig mit der Erzeugung unerwünschter stabiler Expression derartiger Enzyme einher (Gleave et al. Plant Mol. Biol. 40, 223 - 235 (1999)), was die Effizienz der Erzeugung der gewünschten genetischen Ereignisse frei von Markergenen und frei von Excision-vermittelnden Enzymen weiter reduziert. In diesen Systemen hängt die Reproduzierbarkeit deshalb stark von der reproduzierbaren und präzisen Expression Excision-vermittelnder Enzyme ab. Die Gesamteffizienz der Erzeugung der erwünschten genetischen Ereignisse ist im Vergleich zu transgenen Pflanzen mit Markergenen reduziert.

Weiterhin sind *Agrobacterium*-vermittelte Transformationsverfahren bekannt. Solche Verfahren wurden prinzipiell in dikotylen Pflanzen genutzt. *Agrobacterium*-vermittelte Transformation in Dikotylen erleichtert die Übertragung von größeren Stücken heterologer Nukleinsäuren verglichen mit anderen Transformationsmethoden, wie Partikelbeschuß, Elektroporation, Polyethylenglykol vermittelte Transformationsverfahren und dergleichen. Zusätzlich scheint die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation relativ selten Genrekombination zu erzeugen und resultiert eher in der Integration einer geringen Zahl von Genkopien im pflanzlichen Chromosom.

Monokotyle sind kein natürlicher Wirt von *Agrobacterium*. Obwohl *Agrobacterium*-vermittelte Transformation für Spargel (Bytebier B., et al. Proc. Ntl. Acad. Sci. USA 84:5354-5349, 1987) und für *Dioscorea bulbifera* (Schafer et al. Nature 327:529-532, 1987) veröffentlicht wurde, war es allgemein anerkannt, daß Pflanzen der Familie Gramineae nicht mit *Agrobacterium* transformiert werden können (Potrykus I. Biotechnology 8: 545-543, 1990).

Monokotyle Pflanzen (Monokots) sind im allgemeinen weniger aufnahmefähig als dikotyle bezüglich der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation, und somit wurden weithin direkte



DNA Transfer Verfahren für die Transformation von Monokotylen genutzt. Direkte DNA Transfervorgänge umfassen die Aufnahme reiner DNA, stimuliert durch Polyethylenglykol oder Elektroporation und die Transformation mittels der Partikelkanone. Zur Übersicht siehe Gene Transfer to Plants, Potrykus et al., eds., Springer-Verlag, Berlin, 1995.

*Agrobacterium* vermittelter Gentransfer resultiert gewöhnlich in der Insertion eines diskreten, nicht rekombinanten DNA Segments in das Wirtsgenom, und folglich wäre es wünschenswert, Verfahren für die *Agrobacterium* vermittelte Transformation von Monokotylen zu entwickeln. Obwohl Monokotyle als relativ schwierig bezüglich der Transformation mit *Agrobacterium* gelten, gibt es verschiedene Berichte vom Gentransfer in Monokotyle mit *Agrobacterium*-vermittelter Transformation (Boulton et al. (1989) Plant Mol. Biol. 12: 31; Chan et al. (1992) Plant Cell Physiol. 33:577, Gould et al. (1991) Plant Physiol. 95:426; Graves et al. (1986) Plant Mol. Biol. 7:43; Grimsley et al. (1987) Nature 325:177; Raineri et al. (1990) Bio/Technology 8:33; U.S. Pat. No 5,177,010 von Goldman et al. und U.S. Pat. No. 5,187,073 von Goldman et al.).

Viele von diesen frühen Studien zur *Agrobacterium*-vermittelten Transformation von Monokotylen waren jedoch Objekt der Kontroverse (Potrykus (1990) Bio/Technology 8: 5350) und wurden nicht unabhängig bestätigt.

Aktuellere Studien berichten über erfolgreiche *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von Gerste (Tingay et al. Plant J. 11, 1369 - 1376 (1997), Weizen Cheng et al. Plant Physiol. 115, 971 - 980 (1997) und Reis (Hiei et al. Plant J. 6:271(1994), Dong und andere (1996) Molecular Breeding 2:267). Kultivierte unreife Scutella wurden mit Partikeln beschossen und dann mit *Agrobacterium* für 2 bis 3 Tage kokultiviert, gefolgt von einer Kalluskultur mit selektivem Agens und der Regeneration von transgenen Gerstepflanzen (Tingay et al. Plant J. 11, 1369-1376 (1997). Cheng et al. Plant Physiol. 115, 971 - 980 (1997) kokultivierten entweder drei bis vier Stunden vorkultivierte unreife Embryonen (werden als frisch isoliert bezeichnet), ein bis sechs Tage vorkultivierte unreife Embryonen oder zehn bis 25 Tage vorkultivierten embryogenen Kallus mit *Agrobacterium* für 2 bis 3 Tage, gefolgt von einer Kalluskulturphase mit selektivem Agens und der Regeneration von fertilen Weizenpflanzen. Hiei et al. (Plant J. 6:271(1994)), Dong und andere (Molecular Breeding 2:267 (1996)) kultivierten verschiedene Gewebe von Reis, inbegriffen Triebspitzen, Scutella, unreife Embryonen, Kalli, die von jungen Wurzeln und

Scutella induziert wurden, und Zellen in Suspensionskulturen, induziert von Scutella, wurden kokultiviert mit *Agrobacterium tumefaciens*, resultierend in verschiedenen Graden der Expression des Reportertransgens in diesen Geweben. Transgene Pflanzen wurden lediglich von Scutellum-induzierten Kalli regeneriert, die mit *Agrobacterium* kokultiviert wurden. Über stabile Integration, Expression und Vererbung der Transgenen wurde auch berichtet.

U.S. Pat. No. 5,591,616 von Hiei et al. legt ein Verfahren offen für die Transformation einer Monokotylen (Reis), bestehend aus der Transformation einer Gewebekultur während des Dedifferenzierungsprozesses oder einer dedifferenzierten Gewebekultur mit *Agrobacterium*. Die Gewebekultur erhält man durch Kultivierung eines Explantats für mehr als sieben Tage auf einem Dedifferenzierungsmedium. Der verlängerte Kultivierungsprozeß bei diesem Verfahren hat den Nachteil, daß das Risiko unerwünschter Eigenschaften erhöht wird.

Die weiterführenden Verfahren der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation von Reis involvieren den Gebrauch von Langzeit *in vitro* Selektionsverfahren in Gewebekulturen nach dem Transformationsprozess. Gewebekulturmanipulationen wurden assoziiert mit der Induktion von somaklonaler Variation (Kaeppler et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8773; Phillips et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5222). U.S. Pat. No. 6,037,522 beansprucht ein *Agrobacterium*-vermitteltes Roggentransformationsprotokoll unter Verwendung von unreifen Blütenständen als Zielgewebe für den Gentransfer. Die Beispiele jedoch schließen nur transgene Reispflanzen ein. Roggen ist erheblich „widerspenstiger“ bezüglich der Gewebekultur als Reis. Unreife Blütenstände stellen nach unseren Untersuchungen kein geeignetes Zielgewebe für die Roggentransformation dar.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein effizientes, rasches und einfaches Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen zu entwickeln.

Insbesondere sollte das Auftreten von somaklonaler Variation während der Gewebekultur verringert werden, um möglichst viele Regeneratpflanzen pro Explantat zu gewinnen. Um ein Verfahren mit möglichst kurzer Gewebekulturphase zu entwickeln wurden in einer Variante die unreifen Embryonen unmittelbar nach dem Explantieren mit *Agrobacterium* kokultiviert. In einer anderen Variante wurde die Phase des undifferenzierten Gewebewachstums nach Gentransfer minimiert. In einer dritten Variante wurde ein markergen-freies und selektionsagens-freies Verfahren entwickelt für bezüglich der Gewebekultur „widerspenstige“ Pflanzenarten wie

Monokotyle, bevorzugt für Roggen, Gerste und Weizen, da die Vermeidung des Einsatzes von Selektionsagenzien eine erhöhte Wüchsigkeit und Regenerationsfähigkeit der transgenen Gewebekulturen erlaubt. Ein wichtiger Aspekt dieser Variante ist, daß bei dem richtigen Timing von Gentransfer, Gewebekultur und Regenerationsbeginn ein hoher Anteil an transgenen Pflanzen neben nicht transgenen Pflanzen aus Gewebekulturen nach dem Gentransfer regeneriert werden kann und sich diese transgenen Pflanzen bereits während der in-vitro-Phase mittels DNA-Analyse von den nicht transgenen Regeneratpflanzen trennen lassen. Mit dem Verfahren sollen sonstige wichtige Merkmale wie insbesondere die Regenerationsfähigkeit der Gewebe zu Pflanzen und die Fortpflanzungsfähigkeit und Ertragsfähigkeit der Transformationsereignisse erhalten bleiben. Das Verfahren soll eine reproduzierbar hohe Transformationseffizienz aufweisen und auf ein weites Genotypenspektrum anwendbar sein.

Die Aufgabe wird gemäß den Ansprüchen realisiert. Dabei finden drei Hauptvarianten Verwendung.

Die Hauptvariante 1 ist gekennzeichnet durch eine deutliche Reduzierung der mutagenen Gewebekulturphase, die zur Produktion transgener einkeimblättriger Pflanzen erforderlich ist. Dies erreicht man durch Einführung der Fremd-DNA über Cokultivierung eines frisch explantierten unreifen Embryos mit *Agrobacterium*, das ein Plasmid mit einer heterologen Nukleinsäure enthält, ohne vorherige Vorkultur der Explantate auf einem Kallus induzierenden Kulturmedium.

Die Hauptvariante 2 bezweckt eine möglichst kurze Gewebekulturphase, die sich an den biolistischen oder *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer in unreife Explantate oder die daraus induzierten Kalli anschließt und zur Produktion transgener einkeimblättriger Pflanzen erforderlich ist. Dies wird dadurch erreicht, daß während dieser Phase keine Selektion eingesetzt und nur die Bildung von ersten somatischen Embryonen abgewartet wird, welche in wenigen Tagen bis Wochen nach dem Gentransfer erfolgt. Die Selektion der erfolgreichen Transformationsereignisse erfolgt hierbei vorzugsweise während der Regenerationsphase der monokotylen Pflanzen und zwar während der Entwicklung von Sprossprimordien zu Sprossen.

Die Hauptvariante 3 besteht in der Einführung von Fremd-DNA ohne Markergene in Pflanzengewebe, Kultur der Pflanzengewebe ohne Zusatz von Selektionsagenzien, Regeneration von Pflanzen aus vorgenanntem Pflanzengewebe ohne Zusatz von Selektionsagenzien, DNA-Analyse der gebildeten Regeneratpflanzen und Selektion der transgenen Pflanzen.

Erfindungsgemäß wird Fremd-DNA in regenerierbare Pflanzengewebe eingeführt, dabei kann jede Art von Fremd-DNA in Pflanzenarten eingeführt werden. Allgemein wird als Fremd-DNA jede Art von DNA bezeichnet, die von außen in Pflanzenzellen eingeführt wird. Methoden, um diese DNA in Pflanzenzellen einzuführen, sind dem Fachmann bekannt, wie z.B. ein Partikelbeschuß unter Verwendung einer Vorrichtung, die im US-Patent No. 5,179,022 beschrieben ist.

Die in Fremd-DNA eingeschlossene DNA-Art umfaßt DNA, die bereits in der Pflanzenzelle vorhanden ist, DNA von einer anderen Pflanze, DNA von einem anderen Organismus, oder extern erzeugte DNA, wie DNA-Sequenzen, die eine antisense-Botschaft von einem Pflanzengen enthalten, oder DNA-Sequenzen, die eine synthetische Version eines Gens enthalten, worin die Nukleotidsequenz modifiziert worden ist.

Der erste Schritt der vorliegenden Erfindung besteht darin, dass man regenerierbares Gewebe von einer Pflanze isoliert. Jedes regenerierbare Pflanzengewebe kann gemäß vorliegender Erfindung benutzt werden. Als regenerierbares Pflanzengewebe wird gewöhnlich ein Gewebe bezeichnet, das nach Einführung von Fremd-DNA zu einer differenzierten Pflanze regeneriert werden kann. Bevorzugt handelt es sich bei derartigem Gewebe um unreife oder reife zygotische Embryonen oder aus diesen Geweben induzierte Kalli (Altpeter et al. Plant Cell Rep. 16, 12 - 17 (1996)).

In einer bevorzugten Ausführungsvariante der vorliegenden Erfindung wird ein unreifer Pflanzenembryo als Zielgewebe für den Gentransfer ohne vorherige Vorkultur benutzt. Unreife Embryonen können unter Verwendung bekannter Methoden nach dem Stand der Technik erzeugt werden. Zum Beispiel wurde die Erzeugung unreifer Weizenembryonen von Vasil et al. (1993) beschrieben und die Erzeugung unreifer Roggenembryonen von Castillo et al. (1994).

In einer alternativen Ausführungsvariante werden Kalli als regenerierbare Zielgewebe für den Gentransfer eingesetzt. Die bevorzugten Kalli sind embryogene Kalli, welche von unreifen Embryonen durch eine kurze, maximal siebentägige Kulturphase erzeugt werden. Derartige Kalli können durch Isolierung und Kultivierung unreifer Embryonen auf einem Nährmedium mit

Kohlenhydraten und pflanzlichen Wachstumsregulatoren erzeugt werden. Kallus-erzeugende Medien sind nach dem Stand der Technik wohlbekannt und jedes Kulturmedium oder jede Präparationsmethode kann verwendet werden.

Ist das regenerierbare Pflanzengewebe isoliert, besteht der zweite Schritt des Verfahrens in der Einführung von Fremd-DNA in das Pflanzengewebe. Dieser Prozess wird hier weiter als Transformation bezeichnet. Jede Methode kann zur Einführung von Fremd-DNA in regenerierbares Pflanzengewebe benutzt werden. Solche Methoden schließen Partikelbeschuß (Weeks et al., (1993)); Vasil et al., (1992)), *Agrobacterium*-Transformation (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22, 491 - 506 (1993)), Elektroporation von regenerierbarem Gewebe (Shillito et al., Bio/Technology 3, 1099 - 1103 (1985)), Siliziumcarbidfaser-vermittelte Genübertragung (Dalton et al., Plant Sci. 132, 31 - 43 (1999)) und Protoplasten-vermittelte Genübertragung (Shimamoto et al., (1989), Datta et al. (1990)) ein.

In den Hauptvarianten der Erfindung wird das regenerierbare Gewebe bevorzugt unter Verwendung von *Agrobacterium* oder der Partikelbeschuß-Methode transformiert. Es werden bevorzugt unreife Embryonen ohne Vorkultur benutzt. Nach dem Gentransfer wird von dem Explantat Kallus induziert.

In einer bevorzugten Ausführungsvariante der Erfindung wird das regenerierbare Gewebe für eine kurze Periode nach der Einführung der Fremd-DNA, z.B. dem Partikelbeschuß oder dem *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer, kultiviert. Das für diese Wachstumsperiode verwendete Nährmedium enthält keinerlei Selektionsmittel und dieses Nährmedium führt zu undifferenziertem Zellwachstum und bereitet die anschliessende Pflanzenregeneration vor. Diese Kulturperiode wird kurz gehalten, und beträgt bis zu sechs Wochen, vorzugsweise dauert sie nicht länger als etwa vier Wochen und am besten nicht länger als 7 bis 17 Tage. Eine längere Periode undifferenzierten Wachstums ist gemäß vorliegender Erfindung nicht erforderlich.

Nach der Transformation und einer kurzen Phase mit undifferenziertem Gewebewachstum wird das regenerierbare Pflanzengewebe in ein Sprossinduktionsmedium übertragen, das die Regeneration von Pflanzen aus dem Gewebe induziert, wobei das zur Regeneration benutzte Sprossinduktionsmedium vorzugsweise keinerlei Selektionsmittel enthält. Dies steht im Gegensatz zum bisherigen Stand der Technik, wonach regenerierbare Pflanzengewebe zunächst

eine ausgedehnte Selektionsperiode durchlaufen müssen, ehe die regenerierbaren Gewebe in das Sprossinduktionsmedium übertragen werden (Vasil et al., 1993; Castillo et al., 1994), oder wonach regenerierbare Pflanzengewebe einer Selektionsperiode während der Exposition in einem Sprossinduktionsmedium ausgesetzt werden (EP 0709462).

Das für diesen Schritt benutzte Sprossinduktionsmedium kann jedes Medium sein, das die Bildung von Sprossen aus regenerierbarem Gewebe ermöglicht. Ein bevorzugtes Sprossinduktionsmedium ist frei von pflanzlichen Wachstumsregulatoren für die Spross- und Wurzelbildung aus regenerierbarem Gewebe (beispielsweise ein Medium nach Weeks et al., 1993).

Das regenerierbare Pflanzengewebe wird erfindungsgemäß so rasch wie möglich nach der Transformation in dieses Medium übertragen. Die Regeneration der Sprosse erfolgt vorzugsweise über somatische Embryogenese. Vorzugsweise geschieht dies zwischen einem Tag und 6 Wochen, vorzugsweise nicht später als 4 Wochen, am besten nicht später als 7 bis 17 Tage nach Einführung der Fremd-DNA.

Nachdem sich wenigstens ein Spross gebildet hat, wird ein kleiner Teil des Sprosses zur DNA-Extraktion oder Proteinextraktion abgenommen. Jede Methode zur DNA-Analyse oder Proteinanalyse, welche die Bestimmung kleiner DNA-Mengen bzw. Proteinmengen erlaubt, ist mit dem vorliegenden Verfahren kompatibel. Erfindungsgemäß wurde vorzugsweise die Polymerasekettenreaktion benutzt, um transgene Pflanzen zu identifizieren, die über den biolistischen Gentransfer transformiert wurden. Pflanzen, die über *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer erstellt wurden, wurden vorzugsweise mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) identifiziert. Die Identifizierung transgener Pflanzen kann vor oder nach der Übertragung der Pflanzen in Erdkultur erfolgen. Bevorzugt erfolgt die DNA-Analyse während der *in vitro*-Kultur der transgenen Pflanzen, was die arbeitsaufwendige Übertragung zahlreicher nicht-transgener Pflanzen in Erde vermeidet.

Die Pflanzen können dann in Erdkultur übertragen und nach dem Stand der Technik bis zur Samenbildung weiter kultiviert werden.

Die Hauptvariante 1 der Erfindung betrifft die Transformation von Roggen (*secale cereale* L.) mit stabiler Expression des Transgens gemäß der Erfindung mit *Agrobacterium* als Gentransfersystem bestehend aus der Cokultivierung eines frisch gewonnenen Roggenexplantats oder eines von einem Roggenexplantats induzierten Kallus mit *Agrobacterium*, enthaltend ein Plasmid mit einer heterologen Nukleinsäure. Bevorzugt werden hierbei als Explantat unreife Embryonen eingesetzt.

Das Verfahren besteht aus der Kontaktierung mindestens eines unreifen Embryonen oder eines von einem Explantat induzierten Kallus einer Roggenpflanze mit *Agrobacterium*, das geeignet ist, mindestens ein Gen in Zellen des Embryonen oder Zellen des vom Explantat induzierten Kallus zu übertragen. Daraufhin wird der Embryo oder der vom Explantat induzierte Kallus mit *Agrobacterium* kokultiviert. Die Embryonen oder der vom Explantat induzierte Kallus werden danach in einem Medium kultiviert, das die Kallusbildung fördert, unter Zugabe eines Antibiotikums in Konzentrationen, die geeignet sind, das Wachstum von *Agrobacterium* zu unterbinden. Nachfolgend werden die Pflanzen, die das selektierbare Marker Transgen exprimieren, auf einem Medium mit selektivem Agens regeneriert, um Pflanzen zu selektieren, die das Gen exprimieren. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Anwendung eines Markergens und eines Selektionsmediums nicht notwendig, um die Pflanzen, die ein potentiell nützliches Transgen exprimieren, zu identifizieren. Eine bevorzugte Ausführungsform umfaßt die stabile Transformation der regenerierten Pflanzen. Bevorzugt setzt man unreife Embryonen einer Länge von 0,8 mm bis 2,0 mm ein. Die Konzentration von *Agrobacterium* liegt bevorzugt zwischen ca. 0,5 OD und 4,0 OD, besonders bevorzugt zwischen ca. 1,6 OD bis 2,4 OD. Üblicherweise führt man die Kontaktierung in einer Suspension aus. Man kann die Cokultivierung auf festem, flüssigem oder MS Salz haltigem Medium ausführen.

Eine weitere Vorzugsform betrifft die Regenerierung der Embryonen in Medium mit einem Antibiotikum, das geeignet ist, das Wachstums von *Agrobacterium* zu unterbinden. Bevorzugt wird als Antibiotikum Timentin, eine Mischung von 1500 mg Ticarcillin Natrium und 100 mg Kalium Clavunat, verwendet. Besonders geeignet sind Timentin-Konzentrationen zwischen ca. 100 mg/l und 300 mg/l, im besonderen eine Konzentration von 150 mg/l. Die Kultivierung der Embryonen oder alternativer Explantate, wie Infloreszenzen, Achselknospen, Meristeme erfolgt üblicherweise für ca. 0 bis 15 Tage vor der Cokultivierung mit *Agrobacterium*. Bevorzugt

werden die Embryonen oder alternative Explantate, wie Infloreszenzen, Achselknospen, Meristeme für ca. 0 bis 5 Tage vor der Cokultivierung mit *Agrobacterium* kultiviert. Üblicherweise beträgt die Länge des Schrittes der Cokultivierung zwischen einem und vier Tagen. Die Kulturphase vor dem Transfer der Gewebe zu Bedingungen der Pflanzenregeneration beträgt üblicherweise 1 bis 60 Tage nach Cokultivierung, wobei sieben bis 17 Tage bevorzugt sind. Man kann die Selektion für transgene Pflanzen, die das selektierbare Marker Transgen exprimieren, während der ganzen Gewebekulturphase nach Cokultivation oder während der Regenerationsphase durchführen. Bevorzugt wird die Selektion der Markergenexpression während des Streckungswachstums der Sprossprimordien zu Sprossen durchgeführt. Eine andere bevorzugte Variante (Hauptvariante III) verzichtet vollständig auf den Einsatz von Selektionsmarkergenen und die Verwendung von entsprechenden Selektionsagenzien. Das Auffinden der transformierten Pflanzen erfolgt über biochemische Detektionsverfahren (ELISA).

Die Hauptvarianten I bis III des vorliegenden erfindungsgemäßen Verfahrens sind durch zahlreiche Vorteile gekennzeichnet.

1. Das Verfahren ist nicht auf bestimmte Pflanzenarten beschränkt. Es hängt lediglich von der Verwendung regenerierbarer Pflanzengewebe und damit von Gewebekultur-Bedingungen, Verfahren und Gentransfermethoden ab, welche die Regenerationsfähigkeit transformierter Gewebe unterstützen und zugleich die Effizienz des Verfahrens fördern.
2. Mit der beschriebenen markerfreien Transformationsmethode wird eine höhere Transformationsfrequenz erreicht als in früher publizierten Fällen (Castillo et al., 1994). Diese Aussage über die Transformationsfrequenz gilt für jene Frequenz, die bei markerfreiem Verfahren beobachtet wurde, wobei komplizierte, die Effizienz verringemde Markereliminierungsexperimente unnötig sind. Infolge der raschen Erzeugung transgener Pflanzen, die von selektier- und screenbaren Markergenen frei sind, können Risikoermittlung und Kommerzialisierung der transgenen Pflanzen beschleunigt und vereinfacht werden. Die Anwendbarkeit dieser markerfreien Transformationsmethode auf z.B. Inzuchtlinien von Roggen erhöht die Reproduzierbarkeit bei dieser "widerspenstigen" und fremdbefruchtenden Pflanze. Pflanzen, die mit diesem Verfahren erzeugt werden, sind generell fertil.
3. Ein anderer erfindungsgemäßer Vorteil besteht darin, dass die bisherigen Transformationsmethoden 8 bis 9 Monate erfordern, um z.B. transgene Roggenpflanzen zu



erhalten (Castilo et al., 1994). Die bombardierten regenerierbaren Gewebe wurden nach dem bisherigen Stand der Technik für 3 bis 4 Wochen auf Selektionsmedium subkultiviert, um eine Kallusvermehrung zu erlauben. Durch Verminderung der Zeit zur Kallusvermehrung laut Hauptvariante II und, oder durch Verwendung von Explantaten ohne Vorkultur laut Hauptvariante I erfordert die erfindungsgemäße rasche Methode weniger als 2 bis höchstens 3 Monate, um z.B. transgene Roggen- Gerste- oder Weizenpflanzen zu erzeugen. Langzeitkultur vor und nach der Transformationsbehandlung und die Anwendung von Selektionsmitteln sind laut Hauptvariante III mit der erfindungsgemäßen Methode nicht erforderlich. Überraschend ist, dass auch nach Durchführung der markerfreien Transformationsmethode die transformierten Zellen ebenso schnell regenerieren wie nicht-transformierte Zellen und somit der Anteil an transgenen und nichttransgenen Pflanzen an den Gesamtregeneratpflanzen keine automatisierte molekulare Analyse erfordert, obwohl sich mit dieser die Effizienz des Verfahrens erhöhen lässt.

4. Die Regenerate waren sowohl in *in vitro*-Kultur als auch in Erdkultur kräftiger und gesünder als solche, die von Selektionsmedien stammen.

Die Hauptvariante III der vorliegenden Erfindung stellt somit ein schnelles, reproduzierbares und effizientes System zur Erzeugung von transgenen Pflanzen dar, die frei von selektier- oder screenbaren Markergenen sind. In einer bevorzugten Ausführungsvariante liefert sie ein schnelles und effizientes Marker-freies Transformationssystem für monokotyle Kulturpflanzen unter Verwendung von unreifen Embryonen als Ausgangsgewebe. Insbesondere ist das Verfahren für die Transformation und Regeneration von transgenen Roggen-, Gersten- und Weizenpflanzen einsetzbar. Die erfindungsgemäß regenerierten Pflanzen sind phänotypisch normal und voll fertil. Transgene Pflanzen, die frei von selektier- und screenbaren Markergenen sind, können bereits innerhalb von weniger als zwei bis höchstens drei Monaten nach der Präparation der Primärexplantate in Erdkultur überführt werden. Die Transgene werden stabil an die F1-Nachkommenschaft vererbt.

Mit dem Verfahren ist die Realisierung eines wesentlichen Ziels bei der Herstellung transgener Pflanzen gelungen, nämlich die öffentliche Akzeptanz von transgenen Kulturpflanzen durch Reduktion von nachteiligen Umwelteffekten, die die Verwendung selektierbarer Marker mit sich bringt, zu verbessern. Es kann mit dem einfachen und schnell durchführbaren Verfahren den

regulatorischen Anforderungen der betreffenden Gewebe entsprochen werden, und es werden transgene Kulturpflanzen mit wertsteigernden Gensequenzen erzeugt, die frei von selektier- und screenbaren Markergenen sind.

Obwohl selektier- und screenbare Marker nicht erforderlich sind, können darüber hinaus (wenn notwendig) auch verschiedene selektierbare Markersysteme, einschließlich Herbizide wie Bialophos und ebenso Antibiotika, wie Paramomycin oder Hygromycin, oder andere screenbare Marker, wie GUS oder GFP, zusammen mit dem beschriebenen Verfahren der Hauptvarianten I und II benutzt werden.

Die erfindungsgemäß beschriebene rasche markerfreie Transformationsmethode produziert gewöhnlich auch einheitliche, nicht-chimärische Transformanten. Regeneration erfolgt bevorzugt über somatische Embryogenese. Infolge der kurzen Gewebekulturzeit sind embryogene Kallussektoren auf dem Stadium der Regeneration klein. Daher wird nur ein Sproß von jedem Kallussektor regeneriert. Wie die PCR-Analyse auf stabile Transgenintegration zeigte, sind Blattsegmente von verschiedenen Teilen der transgenen Pflanzen einheitlich in der Transgenintegration. Nachkommenschaftsanalysen zeigten ebenfalls, dass die meisten der transgenen Pflanzen nach Selbstung im Verhältnis 3 : 1 zwischen transgenen und nicht-transgenen Pflanzen spalteten, wie für ein einzelnes dominantes Gen zu erwarten war.

Die vorliegende Erfindung bietet Vorteile für Pflanzenarten, die widerspöntig in der Gewebekultur sind. Sie ist insbesondere für monokotyle Arten brauchbar. Noch spezieller ist sie für Pflanzen brauchbar, die nicht für lange Zeit auf dem Kallusstadium gehalten werden können, ohne die Regenerationsfähigkeit zu verlieren. Drei besonders brauchbare Spezies sind in der vorliegenden Erfindung Roggen, Gerste und Weizen.

Es ist insbesondere hervorzuheben, dass zum ersten Mal die reproduzierbare Erzeugung von transgenem Roggen in ausreichender Anzahl für genetische Studien und kommerzielle Anwendungen möglich wurde. So konnte für Roggen und Weizen festgestellt werden, dass das Verfahren genotypunabhängig ist. Das heißt, dass diese Methode mit jeder Art von Roggen- und Weizensorte benutzt werden kann, einschließlich sowohl Winter- als auch Sommerweizen und -roggen. Sie kann verwendet werden, um transgene Pflanzen von Sommerroggen-Inzuchtlinien

wie zum Beispiel L22 oder Winterroggen-Inzuchtlinien wie L20, Sommerweizensorten wie z.B. Bobwhite und Winterweizenzüchtstämme wie W08 zu erzeugen. D.h. das Verfahren ist sogar für homozygote Inzuchtlinien fremdbestäubender Arten wie Roggen und Elitegenotypen von Weizen anwendbar.

Vorteile der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation liegen darin, dass in der Regel einfachere Transgeninsertionsmuster als beim biolistischen Gentransfer oder der direkten Aufnahmen von DNA in Protoplasten auftreten. Zudem werden Transgene in der Regel mittels *Agrobacterium* im Gegensatz zu den alternativen Gentransferverfahren in aktiv transkribierten Regionen inseriert. Einfache Transgenintegrationsmuster und Insertion in aktiv transkribierten Regionen führt zu einer stabilen Transgenexpression in generativen Nachkommen. Zudem können mittels *Agrobacterium* grössere DNA-Fragmente übertragen werden als mit anderen Gentransferverfahren, was insbesondere für Komplementationsstudien und für die Veränderung ganzer Stoffwechselwege Bedeutung hat.

Mit den nachfolgenden Beispielen wird die Erfindung näher erläutert. Die Beispiele gelten in keiner Weise als Einschränkung der vorliegenden Erfindung.

#### 1. Hauptvariante I

Herstellung transgener Gerstenpflanzen mittels *Agrobacterium* - vermitteltem Gentransfer.

*Agrobacterium*stammAGL1 (Lazo et al. 1991) mit zwei konstitutiven Expressionskassetten in der T-DNA (Hygromycin B Resistenzgen *hph* unter Kontrolle des 35S-Promotors und *nos* terminators und das Reportergen *gfp* unter Kontrolle des *ubiquitin* Promotors und *nos* Terminators) wurde mit frisch explantierten zuvor nicht vorkultivierten Gerstenembryonen für 2-3 Tage auf Kallusinduktionsmedium nach Hagio et al. (Plant Cell Rep 14: 329-334 (1995)) kokultiviert. Anschließend wurden die Explantate auf 150mg/L timentinhaltigem Kallusinduktionsmedium kultiviert und nach weiteren fünf Tagen auf selektivem Kallusinduktionsmedium mit 10-30mg/L Hygromycin B und 150mg/L Timentin kultiviert. Nach ein bis drei zweiwöchigen Selektionsphasen wurden die Explantate auf selektives Regenerationsmedium (Hagio et al.) überführt und nach weiteren 5 Wochen konnten regenerierte Pflanzen in Erde gepflanzt werden.

Abbildung 1a-d zeigt Expression des *gfp* Gens in unterschiedlichen Stadien der Gewebekultur und Transgennachkommen, als auch den molekularen Nachweis für Transgenintegration (E: Southern blot) und Transgenexpression (F: Western blot).

## 2. Hauptvariante II

Herstellung transgener Roggenpflanzen mittels *Agrobacterium* - vermitteltem Gentransfer.

Es wurden unreife nicht-, oder bis zu 5 Tage- auf einem nach Casillo et al (1994) modifizierten MS medium (Murashige und Skoog, Physiol. Plant. 15: 473-497 (1962) vorkultivierte Roggenembryonen verwendet. Die Explantate bzw. entstandenen Kalli wurden mit auf LB-medium vorkultiviertem *Agrobacterium* infiziert. Mit Hilfe des verwendeten *Agrobacterium*stammes AGL0 (Lazo et al., Bio/Technology 9: 963-967 (1991)) wurde eine T-DNA mit konstitutiver Expressionskassette unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors und NOS-Terminators (Christensen und Quail, Transgenic Res. 4: 44-51 (1996) mit dem selektierbaren *nptII* Markergen übertragen. Kalli wurden 2 bis 3 Tage auf 150mM Acetosyringonhaltigem Kulturmedium mit *Agrobacterium* cocultiviert, danach für 3 Wochen auf 150mg/L Timentinhaltigem Kallusinduktionsmedium der Zusammensetzung nach Castillo et al. (1994) ohne selectivem Agens kultiviert und auf 150mg/L Timentinhaltigem Sproßinduktionsmedium der Zusammensetzung nach Castillo et al. (1994) mit 30mg/L Paramomycinsulfat als selektives Agens regeneriert.

Von den Sprossspitzen regenerierter Pflanzen wurden Blattproben entnommen, die Proteine extrahiert und mittels ELISA und Western blot eine NPTII Expressionsanalyse durchgeführt. In der bevorzugten Behandlung konnten von 500 Explantaten 31 unabhängige transgene Roggenpflanzen identifiziert werden. Diese Pflanzen wurden selektiert und in Erde gepflanzt. Abbildung 2a zeigt ELISA unter Einsatz von 20µg Gesamtproteinextrakt im Vergleich zu 150- und 20pg NPTII Standards. Abbildung 2b zeigt NPTII Western blot ausgesuchter Pflanzen unter Verwendung von 10µg Gesamtprotein und NPTII spezifischem Antikörper.

## 3. Hauptvariante III

Herstellung transgener, markergen-freier Roggenpflanzen mittels biolistischem Gentransfer.

Es wurden unreife Roggenembryonen 3 bis 7 Tage auf einem nach Casillo et al. (1994) modifizierten MS medium (Murashige und Skoog, *Physiol. Plant.* 15: 473-497 (1962) vorkultiviert. Diese Gewebe wurden mit Mikropartikeln die mit zwei konstitutiven Expressionskassetten von Nutzgenen unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors und NOS-Terminators (Christensen und Quail, *Transgenic Res.* 4: 44-51 (1996). Als Beispiele wurden cDNA's unterschiedlicher Fragmentlänge (Gamma-Tocopherolmethyltransferase aus Arabidopsis und des Ferretins aus Erbse) unter Kontrolle der genannten Sequenzen ins Roggen-genom integriert. Die Kultivierung der Kalli nach dem Partikelbeschuss erfolgte für 7 bis 17 Tage in Kallusinduktionsmedium (Zusammensetzung wie bei Castillo et al. 1994) und danach für 4-5 Wochen in einem Sprossinduktionsmedium (Zusammensetzung wie bei Castillo et al. 1994).

4-5 Wochen nach Kulturbeginn auf dem Sprossinduktionsmedium hatten sich bewurzelte Sprosse gebildet. Von den Sprossspitzen wurden Proben entnommen, DNA extrahiert und mittels PCR eine DNA-Analyse durchgeführt. 20 der regenerierten Roggenpflanzen von Kalli, die von 1400 unterschiedlichen Explantaten hervorgegangen sind, wiesen die transformierte Fremd-DNA auf. Diese Pflanzen wurden selektiert und in Erde gepflanzt. Abbildung 3 zeigt PCR-Analysen unter Verwendung von Primerpaaren, die in den die cDNA flankierenden Kontrollsequenzen (ubiquitin Promotor und nos Terminator) initiieren, im Vergleich zur Plasmidkontrolle und Fragmentgrößenmarker (Abb. 3a) und PCR-Analysen unter Verwendung von Primerpaaren, die in dem ubiquitin Promotor und der jeweiligen cDNA initiieren im Vergleich zur Plasmidkontrolle und Fragmentgrößenmarker (Abb.3b) sowie transgene markergen-freie Roggenpflanzen nach Überführung in Erdkulturen (Abb. 3c). Das Transgen wurde stabil auf die generative Nachkommenschaft übertragen wie PCR und Southern blot Analysen (Abb. 3d) belegen.

#### 4. Hauptvariante III

Herstellung transgener, markergen-freier Weizenpflanzen mittels biolistischem Gentransfer.

Es wurden unreife Weizenembryonen 3 bis 7 Tage auf einem nach Casillo et al. (1994) modifizierten MS medium (Murashige und Skoog, *Physiol. Plant.* 15: 473-497 (1962) vorkultiviert. Diese Gewebe wurden mit Mikropartikeln die mit einer konstitutiven Expressionskassette eines Nutzgenes unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors und NOS-

Terminators (Christensen und Quail, Transgenic Res. 4: 44-51 (1996)). Als Beispiele wurde eine Gamma-Tocopherolmethyltransferase aus Arabidopsis unter Kontrolle der genannten Sequenzen ins Weizengenom integriert. Die Kultivierung der Kalli nach dem Partikelbeschuß erfolgte für 7 bis 17 Tage in Kallusinduktionsmedium (Zusammensetzung wie bei Castillo et al. 1994) und danach für 4-5 Wochen in einem Sproßinduktionsmedium (Zusammensetzung wie bei Castillo et al. 1994).

4-5 Wochen nach Kulturbeginn auf dem Sprossinduktionsmedium hatten sich bewurzelte Sprosse gebildet. Von den Sprossspitzen wurden Proben entnommen, DNA extrahiert und mittels PCR eine DNA-Analyse durchgeführt. 10 der regenerierten Weizenpflanzen von Kalli die von 500 unterschiedlichen Explantaten hervorgegangen sind, wiesen die transformierte Fremd-DNA auf. Diese Pflanzen wurden selektiert und in Erde gepflanzt. Abbildung 4a zeigt PCR-Analysen unter Verwendung von Primerpaaren die im ubiquitin Promotor und der cDNA der Gamma-Tocopherolmethyltransferase initiieren, im Vergleich zur Plasmidkontrolle und Fragmentgrößenmarker sowie Transgenexpression nachgewiesen mit Northern blot (Abb. 4b).

## Legenden zu den Abbildungen

**Abb 1)** *Agrobacterium*-vermittelter Gentransfer in frisch explantierte unreife Gerstenembryonen (Hauptvariante I). Kokultur von unreifen Gerstenembryonen, die vor der Kontaktierung mit *Agrobacterium* nicht vorkultiviert wurden, führt zur Expression des Transgenes ( in diesem Falle das Reportergen gfp (grünes fluoreszierendes Protein) im Embryogewebe (Abb. A), dem regenerierenden Kallus (Abb B) und den generativen Nachkommen (Abb. D) der fertilen Pflanzen. Die Expression des Transgenes (gfp) ist auch biochemisch über eine Westernblot-Analyse unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers in den Proteinextrakten, gewonnen aus Blattproben verschiedener transgener Gerstenpflanzen (Abb. C; 1-7), nachgewiesen (Abb. F). Die Spezifität des Antikörpers wird durch Reaktion mit gfp-Protein (Abb F; PC) und keine Reaktion mit Proteinextrakten aus nichttransgenen Gerstenpflanzen (Abb. F; NC). Die stabile Integration des gfp-Transgens in das Gerstengenom ist mittels Southern-blot-Analyse unter Verwendung einer radioaktiv markierten Probe aus dem codierenden Bereich des gfp-Transgens in verschiedenen Gerstenpflanzen durch Hybridisierungssignale nachgewiesen (Abb. E 1-11). Identisch behandelte DNA-Extrakte nichttransgener Gerste (Abb. E; NC) zeigen kein Hybridisierungssignal.

**Abb. 2)** NPTII Expression regenerierter transgener Roggenpflanzen (*Secale cereale* L.) nach *Agrobacterium*-vermitteltem Gentransfer.

(A) NPTII ELISA mit 20µg Rohproteinextrakt pro Vertiefung (1A: 150pg NPTII Protein; 1B: 20pg NPTII Protein; 1C: 20µg Rohproteinextrakt einer *nptII* transgenen Roggenpflanze; 1D: 20µg Rohproteinextrakt einer Wildtyp Roggenpflanze). Pfeile kennzeichnen Proteinextrakte transgener Roggenpflanzen mit NPTII Expression.

(B) NPTII Western blot mit 10 µg Rohproteinextrakt pro Spur (M: Marker, +K: 20pg NPTII, -K: 20pg Rohproteinextrakt einer Wildtyp Roggenpflanze).

**Abb. 3a)** PCR Analyse genomischer DNA transgener, markergen-freier Roggenpflanzen auf Kointegration zweier Nutzgenexpressionskassetten (γ-

Tocopherol-methyltransferase und Ferretin). **M**: 1Kb Leiter, **K1**: Transgener Roggen mit Kointegration beider Expressionskassetten, **K2**: Ferritin Plasmidkontrolle, **K3**:  $\gamma$ -Tocopherol-methyltransferase Plasmidkontrolle, **WT**: Wildtyp, **1-10**= transgene Roggenpflanzen. Primer, die in den die jeweilige cDNA flankierenden Kontrollsequenzen (ubiquitin-Promotor, nos-Terminator) initiieren, wurden zur DNA-Amplifikation verwendet. Der Vergleich mit der 1Kb Leiter demonstriert die Integration beider vollständiger Expressionskassetten in transgenen Roggenpflanzen 1-10.

**3b)** PCR Analyse genomischer DNA transgener, markergen-freier Roggenpflanzen auf Integration des Ferretin-(links) und des  $\gamma$ -Tocopherol-methyltransferase-Transgens (rechts). **M**: 100bp Leiter, **+P**: jeweilige Plasmidkontrollen, **WT**: Wildtyp, **1-10**= Transgene Roggenpflanzen. Primerpaare, die im ubiquitin- Promotor und der jeweiligen cDNA initiieren, wurden zur DNA-Amplifikation verwendet.

**3c)** Transgene, markergen-freie Roggenpflanzen nach Überführung in Erde.

**3d)** Southern Blot Analyse auf Integration von markergen-freien Roggenpflanzen mit dem  $\gamma$ -Tocopherol-methyltransferase Transgen.

Plasmid-DNA (+P), genomische DNA von Wildtyp (WT) und transgenen Roggenpflanzen (1-8) wurden mit dem Restriktionsenzym *Bgl*II verdaut und auf 0.8% Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrocellulose Membran übertragen und mit einer radioaktiv markierten Sonde (ca. 500bp aus der kodierenden Sequenz des  $\gamma$ -Tocopherol-methyltransferase Transgens) hybridisiert und mit einem Phosphorimager visualisiert.

#### **Abb. 4) Markergenfreie transgene Weizenpflanzen**

**A)** PCR Nachweis der Integration der Expressionskassette Ubiquitin-Promotor – codierende Sequenz Gammatocopherolmethyltransferase aus Arabidopsis – Nos-Terminator in genomische DNA von Winterweizen. Die Primer inserieren im Promotorbereich: Ubi-F2 Universe: 5'- GTC TGG TTG GGC GGT CGT TCT AG – 3' bzw in dem kodierenden Bereich der Gammatocopherolmethyltransferase: gTMT Reverse: 5'- CGC CTC AGT GGA TGT AGC A – 3' mit einem erwarteten Amplifikationsprodukt von 900 bp. **PC**: Plasmidkontrolle, **NC**: DNA einer nichttransgenen Weizensorte wurde als PCR-Template



eingesetzt. 183, 206, 212: unabhängige transgene Weizenlinien. 1-5: DNA extrahiert aus fünf verschiedenen Trieben der transgenen Weizenpflanzen wurde als Template eingesetzt.

**4B)** Northern-blot-Nachweis der Expression der Gammatocopherolmethyltransferase (Pfeil) in transgenen Weizenpflanzen 183 und 212, die ohne Verwendung von Selektionsmarkergenen und ohne Verwendung von Selektionsagenzien erstellt wurden. NC: RNA isoliert aus einer nichttransgenen Weizenpflanze. Zur Hybridisierung wurde eine radioaktiv markierte Sonde aus dem kodierenden Bereich der Gammatocopherolmethyltransferase von Arabidopsis verwendet.

**Patentansprüche**

- 1) Verfahren zur Herstellung transgener, einkeimblättriger Pflanzen, insbesondere solcher Kulturarten, die als sehr "widerspenstig" in der Gewebekultur gelten, durch Einführung von Fremd-DNA gekennzeichnet durch
  - a) Isolierung von regenerierbarem Gewebe von besagten Pflanzen und gegebenenfalls Kultivierung in einem an sich bekannten Gewebekulturmedium,
  - b) Einführung der Fremd-DNA in das Pflanzengewebe nach an sich bekannten Techniken, wobei die Fremd-DNA solche DNA-Sequenzen umfaßt, welche in den Pflanzen zur Verbesserung ihres Nutzens oder zur Erzeugung zusätzlicher Wertstoffe dient, und
  - c) Regeneration von fertilen transgenen Pflanzen
- 2) Verfahren nach Anspruch 1 zur Herstellung transgener markergen-freier Pflanzen, insbesondere solcher Kulturarten, die wie monokotyle Pflanzen als sehr "widerspenstig" in der Gewebekultur gelten, durch Einführung von Fremd-DANN, gekennzeichnet durch
  - a) Isolierung von regenerierbarem Gewebe von besagten Pflanzen und gegebenenfalls Kultivierung in einem an sich bekannten Gewebekulturmedium,
  - b) Einführung der Fremd-DNA nach an sich bekannten Techniken, wobei die Fremd-DNA solche DNA-Sequenzen umfaßt, welche in den Pflanzen zur Verbesserung ihres Nutzens oder zur Erzeugung zusätzlicher Wertstoffe dient, ohne dass besagte DNA einen selektier- oder screenbaren Marker kodiert,
  - c) gegebenenfalls nach kurzzeitiger Kultivierung für die Dauer von mehreren Stunden bis zu vier Wochen in dem unter a) genannten Gewebekulturmedium oder einem anderen Gewebekulturmedium, das keinerlei Selektionsmittel enthält und die Sprossinduktion durch Zugabe von Wachstumsregulatoren unterdrückt, Plazierung der Gewebe in einem an sich bekannten Sprossinduktionsmedium oder dem bevorzugten Sprossinduktionsmedium, das von besagtem Gewebe Sprosse und Wurzeln zu bilden gestattet, wobei das besagte Sprossinduktionsmedium keine Verbindungen zur Selektion regenerierbaren Gewebes enthält;
  - d) nach Bildung von wenigstens einem Spross, Entnahme von Sprossgewebe zur DNA-Extraktion und DNA-Analyse mittels molekularer Methoden bzw. Protein-Extraktion und biochemischer Analyse zum Nachweis von transgenen Pflanzen sowie

- e) Überführen der nach erfolgtem Gentransfer verifizierten transgenen Pflanzen in Erdkultur und
  - f) Weitere Kultivierung der transgenen Pflanzen zur Erreichung einer stabilen Vererbung der Transgenintegration und -expression in sexuellen Nachkommenschaften der transgenen Pflanzen.
- 3) Verfahren nach Anspruch 1 zur Transformation von Roggen und Gerste mit *Agrobacterium* bestehend aus folgenden Schritten:
- a) Kontaktierung mindestens eines unreifen Embryonen unmittelbar nach der Explantation oder eines von einem Explantat induzierten Kallus mit *Agrobacterium*, das geeignet ist, mindestens ein Gen in das Embryogewebe oder den vom Explantat induzierten Kallus zu übertragen,
  - b) Cokultivierung des Embryonen oder des vom Explantat induzierten Kallus mit *Agrobacterium*,
  - c) Kultivierung des Embryonen oder des vom Explantat induzierten Kallus in einem Medium, das die Kallusbildung fördert, unter Zugabe eines Antibiotikums in Konzentrationen, die geeignet sind, das Wachstum von *Agrobacterium* zu unterbinden,
  - d) Regenerierung der Pflanzen, die das selektierbare Marker Transgen exprimieren entweder auf einem Medium mit selektivem Agens, um Pflanzen zu selektieren, die das Gen exprimieren oder durch Regenerierung aller Pflanzen, wobei auf ein selektierbares Markergen und ein entsprechendes Selektionsmedium verzichtet wird, Sprossinduktion mit anschließender Selektion durch ELISA an Hand aus Sprossteilen extrahierter Proteine und Überführung der nach erfolgtem Gentransfer verifizierten transgenen Pflanzen in Erdkultur bis zur Erreichung einer stabilen Vererbung.
- 4) Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass als regenerierbare Gewebe Antheren, Mikrosporen, Infloreszenzen, unreife oder reife Embryonen, Samen, Blattgewebe, meristematische Gewebe oder Kalli, die aus diesen Geweben induziert wurden, die durch somatische Embryogenese oder Organogenese regenerieren, verwendet werden, bevorzugt unreife Pflanzenembryonen oder aus ihnen induzierte Kalli, die in einem Nährmedium, das keinerlei Selektionsmittel enthält, erzeugt werden.

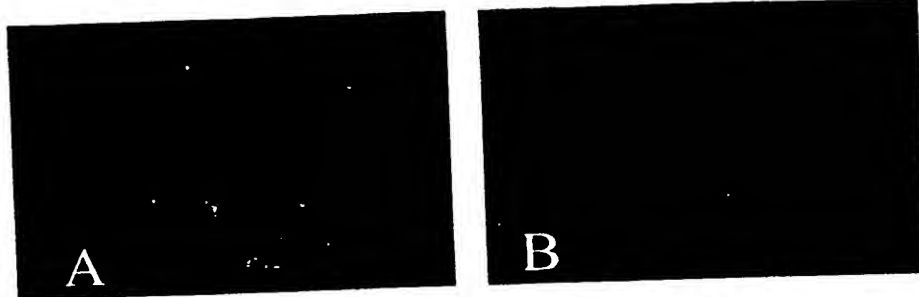
- 5) Verfahren nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, dass als regenerierbare Gewebe unreife Embryonen oder daraus induzierte Kalli von selbstbefruchteten homozygoten Spenderpflanzen in einem Gewebekulturmedium kurzzeitig kultiviert werden und die Einführung der Fremd-DNA in diese Gewebe erfolgt und diese Gewebe bevorzugt über somatische Embryogenese oder über Organogenese zu Pflanzen regeneriert werden.
- 6) Verfahren nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, dass als regenerierbares Gewebe meristematisches Gewebe isoliert wird und die Einführung der Fremd-DNA in diese Gewebe oder daraus induzierte Kalli erfolgt und diese Gewebe über somatische Embryogenese oder Organogenese zu Pflanzen regeneriert werden.
- 7) Verfahren nach Anspruch 1,2 und 4-6, dadurch gekennzeichnet, dass das regenerierbare Gewebe aus einem weiten Spektrum von Genotypen und Kulturarten gewonnen wird.
- 8) Verfahren nach Anspruch 1-7, dadurch gekennzeichnet, dass bei fremdbefruchtenden Kulturarten, wie Roggen, regenerierbares Gewebe aus homozygoten Inzuchtlinien verwendet wird.
- 9) Verfahren nach Anspruch 1-8, dadurch gekennzeichnet, dass zur Gewebekultur ein Medium verwendet wird, das Nährsalze wie bei Murashige und Skoog 1962 beschrieben, Kohlenhydrate wie z.B. Saccharose und evtl. Wachstumsstoffe wie Auxine oder Cytokinine enthält und vorzugsweise mit Phytigel oder Agarose verfestigt ist.
- 10) Verfahren nach Anspruch 1-9, dadurch gekennzeichnet, dass die Einführung der Fremd-DNA in die regenerierbaren Gewebe mehrere Stunden bis zu vier Wochen nach Kultivierung der regenerierbaren Gewebe erfolgt, vorzugsweise 3 bis 7 Tage nach Kultivierung der Explantate.
- 11) Verfahren nach Anspruch 1-10, dadurch gekennzeichnet, dass die Einführung der Fremd-DNA in die regenerierbaren Gewebe unmittelbar nach der Explantation und ohne vorherige Vorkultur der regenerierbaren Gewebe erfolgt.

- 12) Verfahren nach Anspruch 1-11, dadurch gekennzeichnet, dass als Fremd-DNA eingesetzt werden: DNA, die bereits in der Pflanzenzelle vorhanden ist, DNA von einer anderen Pflanze, DNA von einem anderen Organismus, oder extern erzeugte DNA, wie DNA-Sequenzen, die eine antisense-Botschaft von einem Pflanzengen enthalten, oder DNA-Sequenzen, die eine synthetische Version eines Gens enthalten, worin die Nukleotidsequenz modifiziert worden ist.
- 13) Verfahren nach Anspruch 1,2 und 4 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Einführung der Fremd-DNA durch beliebige Gentransferverfahren wie z.B. Partikelbeschuß, *Agrobacterium*-Transformation, Elektroporation von regenerierbarem Gewebe, Siliziumcarbidfaser-vermittelte Genübertragung und Protoplasten-vermittelte Genübertragung erfolgt, bevorzugt durch Partikelbeschuß oder *Agrobacterium*-Transformation.
- 14) Verfahren nach Anspruch 1-13, dadurch gekennzeichnet, dass die Plazierung in dem Sprossinduktionsmedium nach mehreren Stunden bis zu vier Wochen nach Einführung der Fremd-DNA erfolgt, vorzugsweise 7 bis 17 Tage nach Einführung der Fremd-DNA.
- 15) Verfahren nach Anspruch 1-14, dadurch gekennzeichnet, dass zur Sprossinduktion ein Medium verwendet wird, das Nährsalze wie bei Murashige und Skoog 1962 beschrieben, Kohlenhydrate, wie Saccharose und bevorzugt keine Wachstumsstoffe enthält und vorzugsweise mit Phytigel oder Agarose verfestigt ist.
- 16) Verfahren nach Anspruch 1,2 und 4-15, dadurch gekennzeichnet, dass Selektions- und Screening-Marker-freie transgene monokotyle Pflanzen, vorzugsweise Getreidepflanzen, hergestellt werden, insbesondere Weizen- und Roggen-Pflanzen.
- 17) Verfahren nach Anspruch 1-3, wobei die regenerierten Pflanzen stabil transformiert werden.
- 18) Verfahren nach Anspruch 1-3, wobei die unreifen Embryonen vorzugsweise eine Größe von ca. 0,8 mm bis 2,0 mm Länge zum Zeitpunkt der Explantation haben.

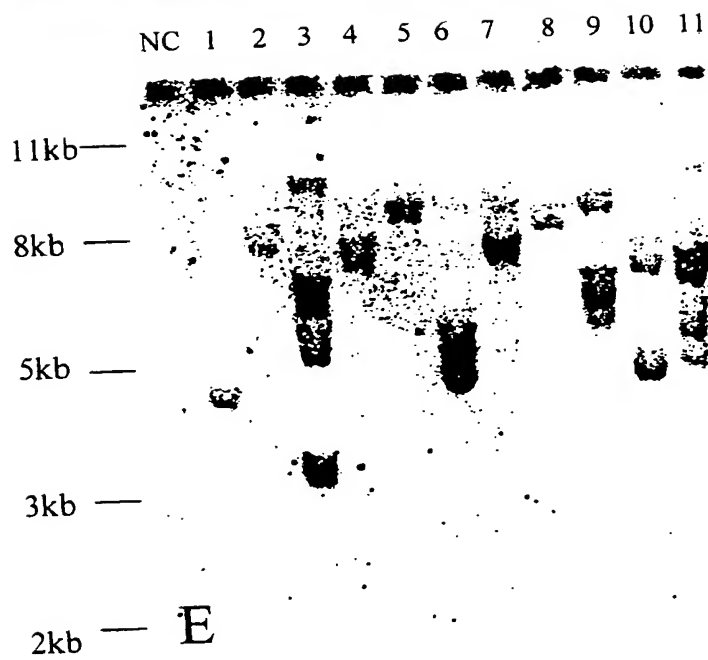
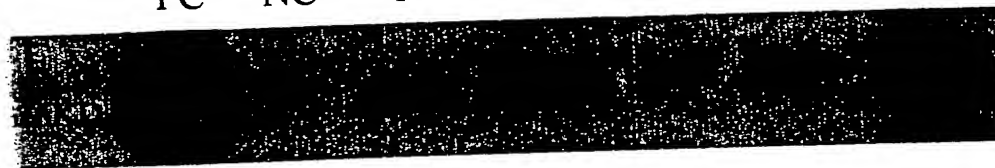
- 19) Verfahren nach Anspruch 1 und 3, wobei die Konzentration von *Agrobacterium* zwischen ca. 0,5 OD und 4,0 OD ist.
- 20) Verfahren nach Anspruch 19, wobei die Konzentration von *Agrobacterium* vorzugsweise zwischen ca. 1,6 OD bis 2,4 OD liegt.
- 21) Verfahren nach Anspruch 1 und 3 und 11 und 12, wobei zum Schritt der Kontaktierung *Agrobacterium* und die Pflanzengewebe in einer Suspension in einer Flüssigkeit vorliegen
- 22) Verfahren von Anspruch 1 und 3, wobei die Cokultivierung auf einem festen Medium stattfindet.
- 23) Verfahren nach Anspruch 1 und 3, wobei der Schritt der Cokultivierung auf einem flüssigen Medium stattfindet.
- 24) Verfahren nach Anspruch 1 und 3, wobei ein MS Salz haltiges Medium für die Cokultivierung verwendet wird.
- 25) Verfahren nach Anspruch 1 und 3, wobei ein MS Salz haltiges Medium für den Regenerationsschritt verwendet wird.
- 26) Verfahren nach Anspruch 1 und 3, zusätzlich den Schritt der Regenerierung der Embryonen umfassend, durch Kultivierung der Gewebe in Medium mit einem Antibiotikum, das geeignet ist das Wachstums von *Agrobacterium* zu unterbinden.
- 27) Verfahren nach Anspruch 1,3 und 26 wobei als Antibiotikum Timentin, eine Mischung von 1500 mg Ticarcillin Natrium und 100 mg Kalium Clavunat, verwendet wird.
- 28) Verfahren nach Anspruch 27, wobei die Konzentration des Timentin zwischen ca. 100 mg/l und 300 mg/l liegt.

- 29) Verfahren nach Anspruch 27, wobei die Konzentration des Timentin 150 mg/l beträgt.
- 30) Verfahren nach Anspruch 1 und 3, wobei die Länge des Schrittes der Cokultivierung zwischen einem und vier Tagen beträgt.
- 31) Verfahren nach Anspruch 1 und 3, wobei die Länge der Kulturphase vor dem Transfer der Gewebe zu Bedingungen der Pflanzenregeneration zwischen 1 und 20 Tagen nach Cokultivierung beträgt.
- 32) Verfahren nach Anspruch 1 und 3, wobei die Länge der Kulturphase vor dem Transfer der Gewebe unter pflanzliche Regenerationsbedingungen bevorzugt zwischen 7 und 17 Tagen nach Cokultivierung beträgt.
- 33) Verfahren nach Anspruch 1 und 3, wobei die Selektion für transgene Ereignisse, die das selektierbare Marker Transgen exprimieren, während der ganzen Gewebekulturphase nach Cokultivierung angewendet wird.
- 34) Verfahren nach Anspruch 1 und 3, wobei die Selektion für transgene Pflanzen, die das selektierbare Marker Transgen exprimieren, während der Regenerationsphase angewendet wird.
- 35) Verfahren nach Anspruch 1 und 3, wobei ein Transgen ohne selektierbares Marker Transgen übertragen wird und keine Selektion angewendet wird.
- 36) Verfahren nach Anspruch 1, 3 und 35, wobei die transformierten Pflanzen durch ein an sich bekanntes molekulares oder biochemisches Detektionsverfahren aufgefunden werden.

Abb. i



PC NC 1 2 3 4 5



BEST AVAILABLE COPY



Abbildung 2

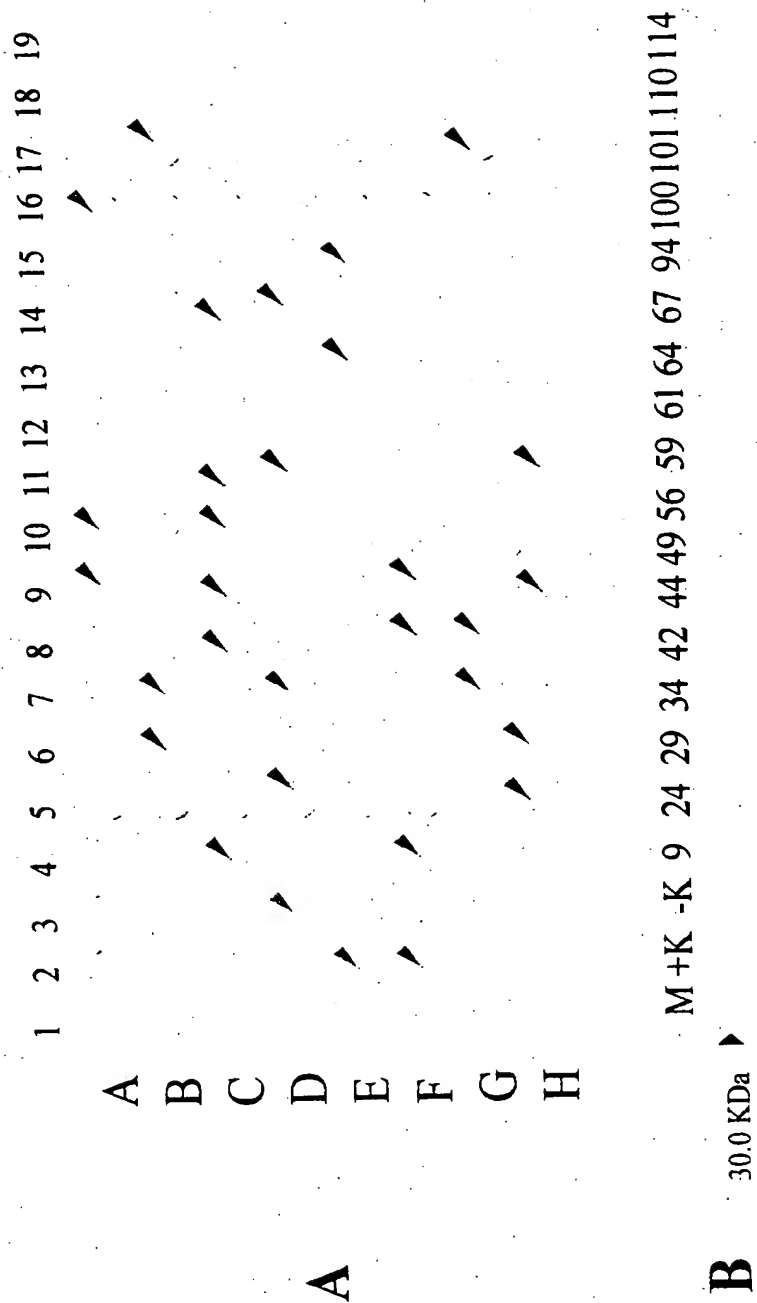
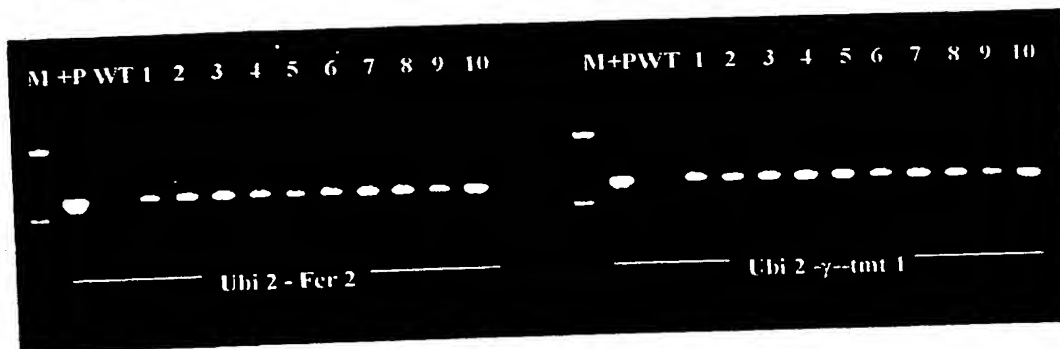


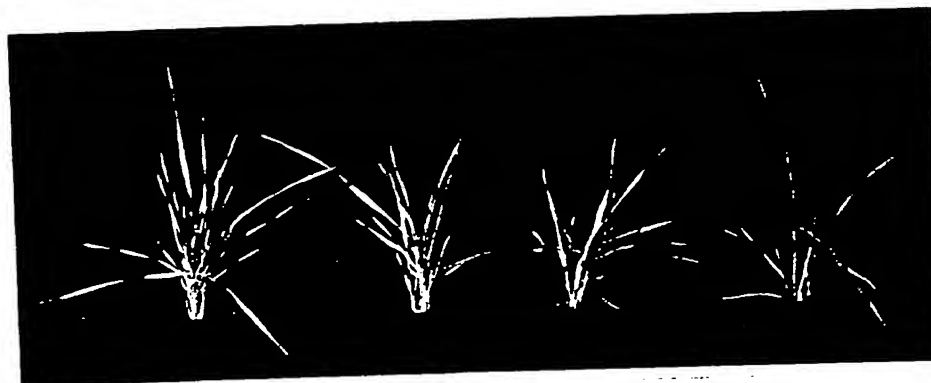
Abb. 3



3a



3b

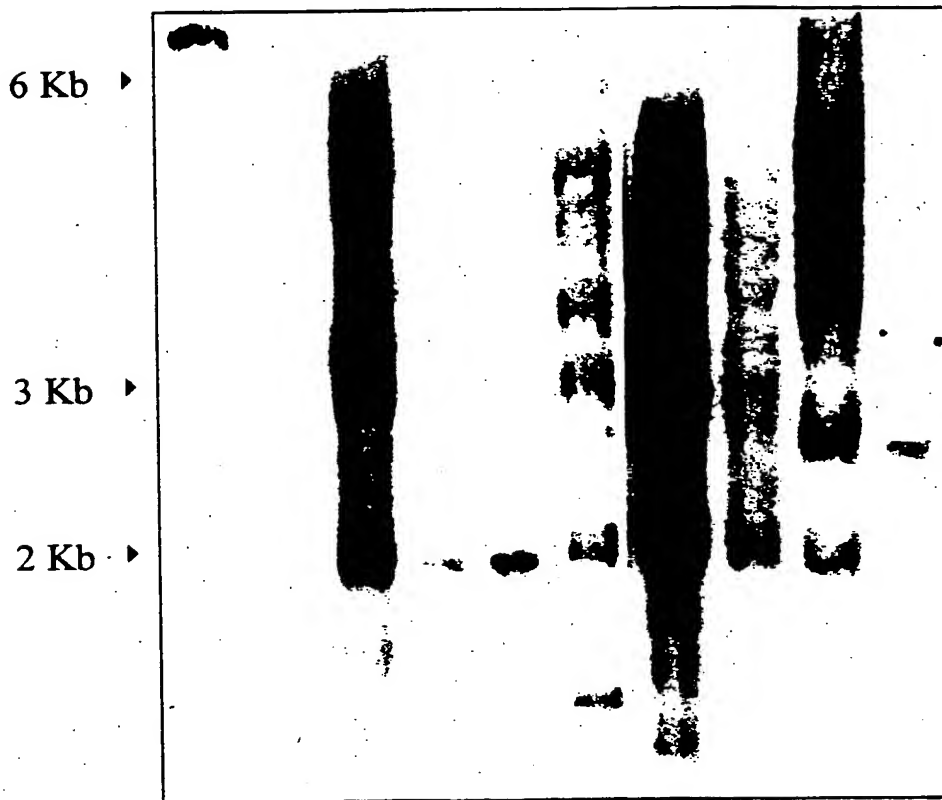


3c

4/4

3d

M +P WT 1 2 3 4 5 6 7 8



183 206 212 4A

Bp MPC NC 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5

1000 ---



NC 183 212 4B



BEST AVAILABLE COPY

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**